

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4 C12Q 1/04, 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO 89/10411  (43) 国際公開日 1989年11月2日 (02.11.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00424 (22) 国際出願日 1989年4月19日 (19. 04. 89)  (30) 優先権データ 特願昭63-97808 1988年4月20日 (20. 04. 88) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品株式会社 (FUSO YAKUHI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 大野典也 (OHNO, Tsuneya) [JP/JP] 〒158 東京都世田谷区深沢2丁目5-15 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松久明生 (MATSUHIRA, Akio) [JP/JP] 〒215 神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘2丁目3番地3街区202号 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 角田嘉宏, 外 (SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル9階 Hyogo, (JP)		(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES AND METHOD OF DETECTING AND IDENTIFYING MICROORGANISMS

(54) 発明の名称 感染症の診断方法及び微生物の検出と微生物の同定の方法



## (57) Abstract

A diagnosis system for infectious diseases and a method of detecting and identifying microorganisms to be used for the system are disclosed. The diagnosis system comprises fixing a sample of a fraction or component containing many phagocytes such as blood, abdominal dropsy, etc., bringing the sample into contact with an avidin-like protein including streptavidin, bringing the sample thus treated into contact with biotin containing thereto a labeling molecule such as an enzyme, antibody, dye or gold, and subjecting the sample wherein a microorganism has been detected to hybridization by using either a radioactive or a non-radioactive probe to thereby identify the microorganism contained in the sample.

(57) 要約

本発明は、感染症の診断システム及びそれに用いることのできる微生物の検出と微生物の同定方法に関し、特に、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定し、検体にストレプトアビジン (Streptavidin) を含むアビジン (Avidin) 様蛋白質を接触させ、前記処理を施した検体に、酵素、抗体、色素、金 (Gold) 等の標識分子を結合させたビオチンを接触させ、菌が検出された検体について、放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行うことにより検体中の菌を同定する診断システムである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FR フランス	MR モーリタニア
AU オーストラリア	GA ガボン	MW マラウイ
BB バルバードス	GB イギリス	NL オランダ
BE ベルギー	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BG ブルガリア	IT イタリア	RO ルーマニア
BJ ベナン	JP 日本	SD スーダン
BR ブラジル	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴ	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク	MG マダガスカル	
FI フィンランド	ML マリ	

## 明 細 書

『感染症の診断方法及び微生物の検出と微生物の同定の方法』

技術分野

（産業上の利用分野）

本発明は、感染症の診断システム及びそれに用いることができる、微生物の検出と微生物の同定の方法に関する。

背景技術

（発明の背景）

感染とは、病理学的に、病原性の微生物（以下菌という）が生体内に侵入し、増殖の足がかりを確立することをいう。それによる発症は宿主生体の抵抗力と菌の毒力との相互関係に依存する。

感染症のなかでも、菌血症の治療方法の改善は以下のとおり重要課題である。

菌血症は、特定の細菌による病気ではなく色々な菌が血液中出现して棲息し始めることにより始まり、臨床的には40度近い熱が2日以上続くとその発病を疑う。症状が高熱であり、また、放置すれば、数日あるいは特に小児、癌の末期で生体の抵抗力が弱まった状態の患者の場合1、2日で亡くなってしまう、という重症かつ緊急な病気である。

感染症において、生体組織内では第一義的には好中球、単球及びマクロファージ系の食細胞がその防衛に働いている。

菌血症での血液中への菌の出現とは、食細胞との戦いで、優勢になった菌が組織から血液中に侵出してきたことと考えられる。

菌血症はこうなっている状態であるから、治療において、起病菌に感受性のある抗生物質を大量に投与する。

ところが抗生物質は一般に、肝臓など生体（臓器）の機能を低下させるものであるから、危険な状態にある患者に有効でない抗生物質を与えることは極力避けなければならない。

一般に、細胞の食菌力が菌の毒力に及ばず、菌が全身の血流中に拡がる場合を菌血症（bacteremia）と定義すれば、菌の産生する毒素の働きで、重い症状を示す菌血症を敗血症（sepsis）と言う。そして、sepsisの証明（すなわち診断の確立）には、1) 臨床症状、2) 培養、3) グラム染色、及び4) ショック状態の確認が重要項目であり、これらの項目が満たされて治療方針を決定する。

したがって、治療には、迅速かつ確実な菌の同定が不可欠である。

（従来技術）

この菌の同定の現行方法では、菌血症を疑われた検体の検査室での菌の検出・同定において、ルーチンとして、カルチャー・ボトル（以下、「C・B」と言う）陽性のものに限って、選択培地を用いて同定が行われるのが一般的な手順である。しかしながら、実際にはこれらの血液検体からの菌の培養の成功率は極めて低い。しかも、菌血症を疑われた時点で、大量に抗生物質を投与されている場合には、たとえ血液中に菌が含まれていたとしても、増菌・発育できない場合が多く、それ故、C・B陽性になる割合は極めて少ない。

また、サブルーチンとしての方法として、菌体成分や菌の代謝産物の機器分析法（辨野義己、ガスクロマトグラフィーによる細菌同定の迅速化、臨床検査、vol.29 No.12 1985年11月、医学書院参照）、特異抗体を利用した方法（日本特許出願公開

昭60-224068 号参照)、さらには、DNA の特異性を利用したハイブリダイゼーションによるもの(日本特許出願公表昭61-502376 号参照)でその特異性に基づいた正確性の高い方法等があるが、いずれも、菌の分離及び増菌培養が不可欠である。

一方、感染症における食細胞の働きに着目したものに、血液試料中の白血球成分が集中しているバフィーコート(Buffy coat)の塗抹染色標本を検鏡する方法がある。

一般にバフィーコート標本で菌が検出される頻度は、成人菌血症では耳朶血のそれと同様に30%にとどまるが、新生児では、10例中 7例(70%)で菌を検出している報告もあり、塗抹標本の検鏡により末梢血中菌の有無に関する情報は治療に大きな指針となっている。

このように、本来、迅速性・確実性が要求される診断分野にもかかわらず、従来法はほとんど治療に寄与しているとは言えない。

(発明が解決すべき問題点)

従来技術の前段における前処理では、少なくとも検体からの選択的分離に1~2日、増菌に1日、固定操作で1日以上、合計で3~4日は十分かかり、現実にはこの培養を菌が発育するまで続けるわけであるので、C・B陽性になった場合ですら一週間以上かかる場合が多い。従って、これが従来法でのC・B陽性での死亡率を高くしている要因となっている。例えば、「日本感染症学誌」, vol. 58, No.2, pp. 122, 1984年の報告によれば、血液培養陽性率が28.6%(163/569件)でも、その内死亡率が84.6%(138/163件)にまで到っていることが報告されている。

その上、培養では常在する菌が混入しても区別できない場合もある。

例えば、菌血症の起因菌として有力であるとされている1つである、ブドウ球菌のなかの表皮ブドウ球菌（エピデルミース（*Epidermides*））とよばれるものは、正常人の皮膚にもある菌なので、注射針を皮膚に刺す時にこれを取り込み検体中に混ざってしまう虞がある。

そして重要なことは、前述した事情から培養すべき検体中には多くの菌は前記食細胞に取り込まれ、抗生物質投与のため死んでいるか静止状態にあるため、培養条件下であるとしても増殖できる菌の数は少ない。このため、実際に臨床検体を用いての培養による菌の検出率は10%前後と、非常に低い。

つまり、臨床的に菌血症を疑うべき患者の血液をさらに一昼夜以上培養して検査しても結局、その90%は菌の存在すら判明しないのが現状である。そこで現在は臨床的に敗血症を疑った段階で、検出結果が出るのを待たずに治療を開始していることは前述の通りである。即ち、最も広範囲な種類の菌に効く、抗生物質を投与し、1、2日様子を見て、効果が現れないと別の抗生物質に切換えるという試行方法である。

また、（従来技術）の後段で述べた染色法では、生体成分も菌と同様に染色されるから、その像の中から形態によってのみ、迅速に菌を判別するのは熟練が必要であり、判定が困難な場合もある。

#### （問題点に関する検討）

一般に細胞は染色して見ることができる。そして、細胞は、入ってきた菌の外側を被う蛋白質を消化しようとする。入りたての菌は外側蛋白質がそのまま残って染色されるが、次第に外側の蛋白質は分解され、次いでDNA 又はRNA が壊れると推定されるが、これらの蛋白質やDNA 又はRNA がどの程度まで分解されているか明らかではない。

いずれにせよ、このようにDNA 又はRNA の方がより長く維持されているだろうから、細胞内の菌を同定するのであれば、細胞内消化程度の大きい蛋白質にではなく、より変性程度の低く保存程度の高いDNA 又はRNA に注目すれば効率がよく正確であろう。また、とりこまれて、菌自体が抵抗性を持ち、残っている場合は言うまでもない。例えば、敗血症の主要起因菌ではないが食細胞内で生存することができる、例えば、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*)、ツベルクローシス (*Tuberculosis*)、リステリア (*Listeria*)、サルモネラ (*Salmonella*)、ブルセラ (*Brucella*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) 等があり、本発明の診断方法に適用可能である。

実験によっても、細胞が菌を取り込んだのち、菌のDNA 又はRNA の特異性は保持されていることが裏付けられている。

### 発明の開示

#### (発明の目的)

さて、感染症の治療のための診断において、検体中の菌を確定することが検査の最終の目的である。

本発明においては、その作業を効率的に進めるため、全体として、下記の(1)の方法及び(1)内のステップとしての(2)、(3)の方法を提供することを目的とする。

- (1) 食細胞に菌が取り込まれていることを確認した検体について、その菌を同定する。
- (2) 食細胞に取り込まれた状態の菌を検出することにより、高率に検出する。
- (3) 食細胞に取り込まれた菌を増菌せずに直接検出することにより、菌を迅速にかつ正確に同定する。

#### (発明の要旨)

〔 1 〕 下記 i ~ ii のステップを含む感染症の診断システム。

- i . 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
- ii . 下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
  - ① . 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。

〔 2 〕 下記 i ~ iii のステップを含む感染症の診断システム。

- i . 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
- ii . 下記①、②のステップを含む方法により、検体中の菌を検出する。
  - ① . 検体にストレプトアビジン (Streptavidin) を含むアビジン (Avidin) 様蛋白質を接触させる。
  - ② . 前記処理を施した検体に、酵素、抗体、色素、金 (Gold) 等の標識分子を結合させたビオチンを接触させる。
- iii . 前記 ii において菌が検出された検体について、下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
  - ① . 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。

〔 3 〕 下記 i ~ ii のステップを含む、検体中の菌を検出する方法。

- i . 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
- ii . 下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
  - ① . 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。



〔４〕下記 i ～ iii のステップを含む、検体中の菌を検出する方法。

- i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
- ii. 検体にストレプトアビジンを含むアビジン様蛋白質を接触させる。
- iii. 前記処理を施した検体に、酵素、抗体、色素、金（Gold）等の標識分子を結合させたビオチンに接触させる。

〔５〕下記 i、ii のステップを含む、検体中の菌を同定する方法。

- i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
- ii. 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。

（作用）

本発明者は、ストレプトアビジン又はアビジンに標識分子を結合したものを用いれば、酵母をも含む菌体成分の種類にかかわらず、定量的に検出できることを見出した。そして、これらの分子は食細胞とは親和性がない。

これはアビジンが、ビオチンに対して、他の物質との結合力の数百倍も高い親和性があり、菌体成分の外膜が一様にビオチンを取り込んでいる可能性が考えられ、アビジンを介して、細胞内の菌の存在を非常に高感度に標識分子により視覚化できるわけである。

しかも、アビジン・ビオチンの生体との結合速度が従来用いていた検出試薬としての抗体より格段に早く 2 ～ 3 時間以内に検出できるという利点をも持っている。

例えば、菌に結合するストレプトアビジンにビオチンを介し

て酵素を結合させて呈色反応を行い、検体中の菌を特定な色として検出することができる。

また、前述したように食細胞が菌を取り込み集菌していることに着目し、そのままサンプルとして適当な処理を施して増菌をしないでインサイテュ(in situ) ハイブリダイゼーションを実施することにより、取り込まれて破壊されつつある菌においてなお維持されているDNA を十分検出できる。従って、増菌の必要なしに行えるから、検出が迅速かつ確実である。

なお、このインサイテュ(in situ) ハイブリダイゼーション法は、組織病理学の分野で、感染したウィルスの検出に用いられているが、以下の事情により菌感染症への応用は確立されていなかった。

即ち、ウィルスは細胞内で増殖し、ハイブリダイゼーションにより検出できるDNA 又はRNA がフリーな状態で十分存在しているが、菌の場合、そのような宿主依存的な増殖方法とはらず、保存されているDNA(RNA)は菌体によって保護されているか、破壊された蛋白質と密着しているか等、細胞内に取り込まれた状態はいろいろに考えられ複雑であり、未だ試みた例はない。

以上をさらにまとめると、

- 1) 菌のDNA 又はRNA の存在状態は、ウィルスのDNA 又はRNA の存在状態とは本質的に異なるが、食細胞の中で最も濃縮されている。
- 2) そのDNA(RNA)は、菌蛋白質よりはダメージが小さく、場合によってはかなりよく保存されている可能性が高い。

結局上記2点に着目した結果、本発明によって、菌においても初めてハイブリダイゼーションによる検出方法が確立されることになった。

ハイブリダイゼーションに用いるプローブを非放射性のもの

、例えば、ビオチン化したものにすれば、放射性同位元素使用施設の無い一般検査室でも光学顕微鏡を用いて検出できるから、迅速、簡便になる。

本発明による感染症の診断方法は、従来の例えば、培養法による検出では、陽性の場合ですら菌の有無を確認するだけで、24時間以上さらにその菌を同定（属、種の決定）するために24～48時間以上かかり全体として3～4日かかったことに比し、上記の作用を有する両方法を単独で又は組み合わせて用いることにより、菌の有無を僅か2～3時間、精々1～2日で迅速かつ明瞭に検出でき、さらにこの検出された検体についても、上記作用を有するインサイテュ(in situ) ハイブリダイゼーション法により迅速かつ正確に菌を同定するから、全体として精々1～2日でずっと的確な検出を実現するという作用を有し、画期的である。また、菌体成分がほとんど消化されて検出されない場合でも、その未変性DNA(RNA)をハイブリダイスし検出できる。

#### 図面の簡単な説明

第1図～第20図は、本発明の実施例の結果を示す生物の形態を表す写真であって、各写真における引き出し線が示すものは下記の通りである：

第1図 プレート1における、ヒト細胞中の淋菌（粒子状のシグナル）。

第2図 プレート2における、ヒト白血球中に取り込まれている菌（同定されていないもの）（臨検）。

第3図 プレート3における、ヒト白血球中に取り込まれているブドウ球菌(in vitro)。

第4図 プレート4における、マウス白血球中に取り込まれて

いるブドウ球菌(in vivo)。

- 第5図 プレート5における、透析患者の透析液からの酵母。
- 第6図 プレート6における、マウス腹水に取り込まれたブドウ球菌由来DNA とのハイブリッド(ブドウ球菌由来のプローブとのハイブリッドシグナル)。
- 第7図 プレート7における、プレート6の方法において他のプローブを用いた例。ハイブリッドシグナルは見えない。
- 第8図 プレート8における、ヒト横隔膜下膿瘍中のブドウ球菌由来DNA とのハイブリッド(ブドウ球菌由来のプローブとのハイブリッドシグナル)。
- 第9図 プレート9における、プレート8の方法において他のプローブを用いた例。ハイブリッドシグナルは見えない。
- 第10図 プレート10における、プローブ24を用いたドットハイブリダイゼーション。
- 第11図 プレート11における、プローブ77を用いたドットハイブリダイゼーション。
- 第12図 プレート12における、プローブ7を用いたドットハイブリダイゼーション。
- 第13図 プレート13における、プローブ36を用いたドットハイブリダイゼーション。
- 第14図 本発明の実施例に用いたブドウ球菌由来のプローブの制限酵素地図。
- 第15図 プレート15における、ヒト血液サンプルと緑膿菌由来DNA プローブとのハイブリッド。
- 第16図～第20図 それぞれプレート16～19における、ヒト血液サンプルとブドウ球菌由来のDNA プローブと

のハイブリッド。

尚、第15図、第16図、第17図、第19図は倍率1000倍の光学顕微鏡写真、第18図は倍率 400倍の光学顕微鏡写真、第20図は第17図の倍率 400倍の光学顕微鏡写真である。

### 発明を実施するための最良の形態

#### A. 検体の調製法

以下の(1)の調製法による検体を、(2)の方法によりスライドガラスに固定し、本発明の各実施例に用いるサンプルとした。

#### (1) 塗抹法における各種臨床検体の調製法

##### ① 血液（ヒト及び動物のヘパリン加全血）からのサンプル調製

血液からのサンプル調製は、以下の2通りのいずれかにより行った。

##### ①-1 モノーポリ溶媒（M-PRM:Flow Laboratories, Inc.）法

3 mlのM-PRM を13×100 mmの試験管に入れ、その上に検体であるヘパリン加全血（採取後2時間以内）3.5 mlを注意深く重層し、室温で30分間、スイングロータを用いて300gで遠心し、多核白血球のバンドのみを採り、これをPBS（等張化リン酸バッファー）で洗浄遠心する。得られた細胞沈澱物を適量（約1 ml）のPBS で懸濁し、検体とする。

##### ①-2 6%デキストラン法

検体であるヘパリン加全血1容(1ml) に6%デキストラン1/3 ～1/4 容を加えて混和し、37℃ 1時間静置し、上層を採り、これをPBS で希釈したのち遠心し、得られた細胞沈澱物を適量のPBS で懸濁し、検体とする。

② 尿からのサンプル調製

尿からの検体をそのまま塗抹する。

③ 腹水からのサンプル調製

腹水を試験管に採り、800r.p.m. 又は3,000r.p.m. で15～30分間室温で遠心し、得られた細胞沈澱物を適量のPBS で懸濁し、検体とする。

④ 膿からのサンプル調製

膿からの検体をそのまま塗抹する。

(2) スライドグラス固定サンプル塗抹法

(1)の操作によりそれぞれ得られた検体を適当量、2%ゼラチンによりコートしたスライドグラス(望ましくは、「H.T. Coating Slide」, Boxy Brown社製を使用)に載せ、ピペットの腹等で延ばし、完全に乾くまで風乾させる。次にカルノア固定液(エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)中にスライドグラスを10分間浸し、細胞の固定を行う。その後スライドグラスを70%エタノール中で軽く洗浄し、風乾する。

実施例 1 アビジン様蛋白質による菌検出法 (以下ストレプトアビジン法という)

本実施例では、アビジン様蛋白質としてストレプトアビジンを用いた。

上記Aの方法により作製した各スライドグラス固定サンプルをPBS 溶液中に室温で10分間以上再水和し、その固定サンプル上に適当量の、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$  スレプトアビジン (Amersham)、1%ウシ血清アルブミン (Sigma フラクシオンFraction V) 及び0.1%トウウィーン20 (Tween 20, 商品名)(Sigma)を含むPBS を載せ、湿潤箱中37℃で60分間反応させたのち、適当量の0.1%トウウィーン20を含むPBS 中で軽く振盪させながら室温で10

分間の洗浄を3回行う。

次に、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$  ビオチン化アルカリフォスファターゼ (E.Y. LABS. Inc.)、1% ウシ血清アルブミン及び 0.1% トゥウィーン20を含むPBS をスライドグラス固定サンプル上に載せ、湿潤箱中37℃で60分間反応させたのち 0.1% トゥウィーン20を含むPBS 中で軽く振盪させながら室温で10分間の洗浄を1回を行い、0.05% トリトン (Triton X-100, Sigma) (以下TXという) を含む AP7.5 (100mM Tris · HCl pH7.5, 100mM NaCl) 中で軽く振盪させながら、室温で10分間の洗浄を2回を行い、さらに AP9.5 (100mM Tris · HCl pH9.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl) 中で軽く振盪させながら室温で10分間の洗浄を3回行う。

次に、 $0.3\text{mg}/\text{ml}$  NBT (ニトロブルーテトラゾリウム, Bethesda Research Laboratories) 及び  $0.17\text{mg}/\text{ml}$  BCIP (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル フォスフェート, Bethesda Research Laboratories) を含む AP9.5 中で37℃暗所で適当な時間発色を行う。反応の停止は10 mM EDTAに数分間浸けることにより行い風乾させる。

最後に適当な濃度のナフトールブルーブラック (Sigma) を用い対比染色を行い、流水中で洗浄し、完全に乾くまで風乾したものに油浸を用い顕微鏡下で菌の有無 (シグナル) を観察する。

なお、菌は紫色のシグナルに、好中球などの細胞は水色～青色として観察できる。

以下に、各プレートについて実施した実験例についてその結果を各プレートの顕微鏡写真に付した引き出し線に従い説明する。

光学顕微鏡は倍率1000倍のものを用了。

プレート 1…尿 (臨床検体) 中の菌 (淋菌) ;

ヒト細胞中の淋菌がフルーに染まった粒子状

のシグナルとなって見える。(第1図)

プレート 2…ヒト血液(臨床検体)から検出された菌(同定されていないもの); 血液調製法はデキストラン法によった。

ヒト白血球中に取り込まれている細菌を示すシグナルが見える。(第2図)

プレート 3…ヒト血液(in vitro)から検出されたブドウ球菌;  
血液調製法はモノーポリ溶媒法により、血液とブドウ球菌とを20分間インキュベートして実施した。

ヒト白血球中に取り込まれたブドウ球菌を示すシグナルが見える。(第3図)

プレート 4…ヒト血液(in vivo)から検出されたブドウ球菌;  
マウスにブドウ球菌を静脈注射し、4時間後、常法に従い血液をサンプリングした。

マウス白血球中に取り込まれたブドウ球菌を示すシグナルが見える。(第4図)

プレート 5…腹膜灌流後の透析液から検出された酵母;  
透析患者から得た。

透析患者の透析液からの酵母を示すシグナルが見える。(第5図)

尚、プレート2, 3, 4の調製法は、いずれも、デキストラン法、モノーポリ溶媒法どちらでも実施できる。

実施例 2 ビオチン化プローブを用いたインサイテュハイブリダイゼーションによる細胞内外における菌(感染菌)の検出・同定(以下プローブ法という)

上記Aの方法に従って作成した各スライドガラス固定サンプル



ルを、PBS 溶液中に室温で10分間以上浸して再水和を行い、サポニン及びTX-100を各々0.25% (w/v)含むPBS 溶液に10分間軽く振盪させながら室温で10分間処理する。

次にリゾチーム(Sigma) とリゾスタフィン(商品名, Sigma) 5mg/mlと、N-アセチルムラミデイスSG(商品名, 生化学工業社製)0.5mg/mlを含むPBS-サポニン(0.05%) 溶液を1ウェルにつき約100  $\mu$ l 滴下し、120 分間室温又は37℃で湿潤箱中に放置する。その後、0.2N HClを含む生理食塩液で20分間洗う。次に、0.1Mトリエタノールアミン-HCl緩衝液(pH 8.0)に0.5%無水酢酸を含む溶液中に20分間浸す。

その後、各スライドガラスを、70%、次に95%のエタノールで洗い、十分風乾する。次に、70mM NaOHを含む生理食塩水溶液に3分間浸し、ただちに、70%次に95%エタノールで洗い、その後、十分風乾したものをインサイテュハイブリダイゼーションのサンプルとする。

続いて、スライドガラス上に固定したサンプル上に以下の組成のハイブリダイゼーション用溶液を適量載せ、湿潤箱中37℃で一昼夜反応させる。

(組成)

- ・ 45%ホルムアミド、
- ・ 2×SSC、
- ・ 1×デンハート液(0.02%ポリビニルピロリドン(Sigma)、0.02%ファイコール(Pharmacia Fine Chemicals)、0.02%ウシ血清アルブミン)、
- ・ 250  $\mu$ g/mlサケ精子DNA(予め100℃5分間熱し、氷中で急冷し、変性させておく、(Pharmacia Fine Chemicals))、
- ・ 10%デキストランスルフェート(Pharmacia Fine Chemicals)、

- ・ 適当量のビオチン化プローブDNA(予め変性させておく)。  
プローブDNA のビオチン化はニックトランスレーション法により行う。例えば、ニックトランスレーションキット (Bethesda Resesrch Laboratories) を用いる。

次に、50%ホルムアミドを含む2×SSC 中で37℃、30分間洗浄し、50%ホルムアミドを含む1×SSC 中で37℃以上の温度、30分間洗浄する。さらに、1×SSC 中で軽く振盪しながら室温で20分間3回洗浄した後PBS 中に室温10分間浸ける。

続いて、ブロッキングを行うためにスライドグラス固定サンプル上に10%正常ウサギ血清 (Vector Laboratories Inc.) を含むPBS を載せ、湿潤箱中37℃で60分間保温処理し、PBS 中で室温数分間浸す。

次に、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトアビジン、1%ウシ血清アルブミン、0.1%トウウィーン20を含むPBS をスライドグラス固定サンプル上に載せ、湿潤箱中37℃で60分間保温し、0.1%トウウィーン20を含むPBS 中で軽く振盪しながら室温10分間で3回洗浄する。

次に、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化アルカリフォスファターゼ、1% BSA、0.1%トウウィーン20を含むPBS をスライドグラス固定サンプル上に載せ、湿潤箱中37℃で60分間保温し、0.1%トウウィーン20を含むPBS 中で軽く振盪しながら室温10分間で洗浄し、0.05%トリトンX-100 を含むAP7.5 中で軽く振盪しながら室温10分間で2回洗浄し、さらにAP9.5 中で軽く振盪しながら室温10分間で3回洗浄する。

つぎに、330  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NBT、170  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BCIP を含むAP9.5 中で37℃暗所で適当な時間発色を行う。反応の停止は10 mM EDTA に数分間浸けることにより行い、風乾させる。

最後に適当な濃度のナフトールブルーブラックを用い対比染

色を行い、流水中で洗浄し、完全に乾くまで風乾したものに油浸を用い、顕微鏡下で発色と特異形態から菌の有無を判定する。

以下に、各実験例についてその結果を各プレートの顕微鏡写真に付した引き出し線に従い説明する。尚、光学顕微鏡は倍率1000倍のものを用了。

#### 実験例 1 ブドウ球菌由来のDNA プローブの調製

下記実験例 2 及び 3 に用いたブドウ球菌由来のDNA プローブの性質は、以下のとおりである。

その調製方法は、テキスト、例えば分子クローニング技術ガイド (Guide to Molecular Cloning Techniques) (酵素学の手法 ((Method in Enzymology)) 中の vol.152) Academic Press 1987 年において確立されたクローニング技術を用い、ブドウ球菌を染色体DNA をベクター (例えば、PBR) に挿入する。

得られた各クローンからブドウ球菌特有のDNA 断片を保有するものを選びそれらをプローブとした。

これらのプローブは、他の細菌 (例えば、大腸菌、クレブシエラ、シュードモナス (Pseudomonas)、エンテロバクタ (Enterobacter) 等又は同属の表皮ブドウ球菌) とはクロスしない。

これらの、プローブの制限酵素地図は、第14図のとおりである。

また、各プローブと臨床株 (黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌。この 2 種は、感染症の原因菌のトップであり、類縁菌であるところから、優先的に実験した) との反応性を以下のとおり調べた。

#### 〔調製法〕

調製法は、前記のテキストにしたがい臨床菌株を培養しそのDNA を抽出する。

これを一定量（例えば5  $\mu$ l）ナイロンフィルタにスポットし、アルカリ変性後ハイブリダイゼーションのサンプルとする。

〔ドット ブロット ハイブリダイゼーション〕

同テキストにしたがい、50%ホルムアミド5×SSC、42℃で上記<sup>32</sup>Pラベルしたプローブで終夜ハイブリダイゼーションを実施する。

その後洗いとして、0.1×SSC、0.1%SDS、55℃、20分を2回処理し、-70℃で終夜放射線照射した後、現像した。

これらの各プローブと臨床株（黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌）との反応性を、プレート10, 11, 12, 13に示す。

いずれも、黄色ブドウ球菌をスポットした箇所（第10, 11, 12, 13 図の上2段のスポット）にシグナルが見え、表皮ブドウ球菌をスポットした箇所には見えない（同各図の下2段のスポット）。即ち、これらのプローブは、黄色ブドウ球菌を明確に検出するが、黄色ブドウ球菌の類縁菌である表皮ブドウ球菌とクロスしない。

## 実験例2 マウス腹水中のブドウ球菌の検出

マウス腹腔にブドウ球菌を注入後、4～6時間経過後に開腹し、腹水を取り上記A(1)③の調製法に従って得られた遠心沈澱物を、100  $\mu$ lのPBSで懸濁し、その20～50  $\mu$ lをスライドガラスのウェルに載せて固定サンプルを作成し、前記実施例1に記載した方法に従って、下記のプローブを用いてハイブリダイズした。

この実験結果を、以下に各実験プレート毎に示す。

プレート 6…腹水中に取り込まれたブドウ球菌とブドウ球菌由来のDNA プローブとのハイブリダイゼーション；

ハイブリッドを示すシグナルが見える。

白血球が拡散したシグナルである。(第6図)

プレート 7…大腸菌由来とクレブシェラ(*Klebsiella*) 由来のDNA プローブを用いたハイブリダイゼーション;

ハイブリッドのシグナルが検出されない。(第7図)

### 実験例 3 ヒト横隔膜下膿瘍からのブドウ球菌検出

ヒト横隔膜下膿瘍を生理食塩水で懸濁し、その懸濁液をスライドガラスに塗抹して拡げた後風乾(40 分)し、その後、プレート 7と同様に前処理して、実施例 1 の方法に従って、インサイテュハイブリダイゼーションを実施した。

この実験結果を、以下に各実験プレート毎に示す。

プレート 8…プレート 6, 7 で用いたDNA プローブとのハイブリダイゼーション;

ハイブリッドのシグナルが見える。(第8図)

プレート 9…プレート 6, 7 と同様のプローブを用いたハイブリダイゼーション;

大腸菌由来、クレブシェラ由来のDNA プローブを用いた場合では、ハイブリッドのシグナルは検出されない。

### 実施例 3 インサイテュハイブリダイゼーション法と血液培養法との比較実験

前述した実施例 1 のストレプトアビジン法によって菌が検出されなかった患者から、上記 A (1)①—2 の 6 %デキストラン法及び A (2)のスライドガラス固定サンプル塗抹法に従って、固定サンプルを作成してヒト血液サンプルを調製した。これを、前記

実施例 1 に記載した方法に従って、実験例 1 で調製したブドウ球菌由来の DNA プローブを用いてハイブリダイズした（下記の表 I のプレート 16～19、及び第 16～19 図参照）。

また、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来の DNA プローブを実験例 1 の DNA プローブ調製法と同様な方法で調製した。具体的には、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）の染色体 DNA を制限酵素 Hind III で断片化し、適当なベクター（例えば、pBR322）に入れて増幅させ、他のバクテリア DNA（例えば、大腸菌、クレブシェラ、エンテロバクタ（*Enterobacter*）、スタヒロコッカス（*Staphylococcus*）等）とクロスしないものを選択し、この中から適当な長さのもの（例えば、10 kb、5 kb、4.5 kb など）を用いてプローブとする。

これを前述したように調製したヒト血液サンプルと前記実施例 1 に記載した方法に従ってハイブリダイズした（下記の表 I のプレート 15、第 15 図参照）。

また、上記のヒト血液サンプルを調製した同じ患者の静脈から、ブラッド コレクティング ユニット「ロシュ」を用いて、リコイド BC ボトル「ロッシュ」（日本ロッシュ㈱社製）に血液を無菌的に各々 10 ml 採取し、これを室温でインキュベートし、経日的に観察した。その結果、下記の表 I に示したように、ボトル 15～19 ではそれぞれ菌が検出されなかった（顕微鏡写真示さず）。

以上の結果を下記の表 I に示した。

表 I プローブ法と血液培養法との比較実験結果

プレート or ボトル No.	プローブ法による 検出菌名	血液培養法 1ヶ月以内
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—*
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	—
17	”	—

18	"	— **
19	"	—

注記： \* … 痰からは *Pseudomonas aeruginosa* が検出された  
 \*\* … 便からは *Staphylococcus aureus* が検出された

上記の表 I の結果から明らかなように、従来の血液培養法、ならびに直接ストレプトアビジン法によって菌が検出されなかったものでも、プローブ法を用いれば菌が検出できその検出能が優れていることが判明した。

#### (発明の効果)

先ず第一に、血液培養で陽性でなかった検体につき、食細胞に着目したインサイテュハイブリダイゼーション法では、迅速・確実に菌の同定が可能であった。従って、この診断法の確立は、菌血症の治療に対して画期的な指針を与えることができ、これにより、死亡率の低減が期待される。

さらに、従来の血液培養法では、その検体の調製において、患者より血液サンプルを、菌が検出されるまで経日的に約 5 ～ 10 ml 採取しなければならず、患者に対して肉体的に或いは精神的に苦痛を強いるのに比較して、本発明の診断方法では、患者よりの血液サンプルの採取が一度で良く厳密な無菌操作も不要で、しかもその採取量も例えば、デキストラン法では約 1 ml と極めて少量で良いので、患者に及ぼす肉体的に或いは精神的な苦痛が低減できる。

また、プローブ法のみを用いる本発明による感染症の診断方法では、上記の診断方法においてストレプトアビジン法によって菌が検出されなかった検体でも菌が検出・同定可能であり、さらにその検出・同定能が格段に優れている。

さらにまた、ストレプトアビジン法のみを用いた本発明の検出方法は、非常に明確な検出結果を迅速に与えるものである。

すなわち、この発明はそれ自体、従来の臨床的に菌血症らしいということで抗生物質治療を試み始めざるをえなかった状況に対して、菌血症であることを確定できるという点で、大きな進歩である。

さらに、プローブ法のみを用いた本発明の検出及び同定方法は、菌血症の起因菌の同定に関連しても次の効果がある。すなわち、本ハイブリダイゼーション法によれば、1回分の検体で菌の種類の同定まで実施でき、所要時間は従来法によれば3～4日は十分かかった（しかも検出される率は低い）ものが、本方法で精々1～2日と飛躍的に短縮でき、しかもその検出率も格段と高い。

特に、非放射性標識のうち、特に、ビオチン化プローブを用いれば、簡便にかつ場所を選ばず実施できる。

しかしながら、このDNAのハイブリダイゼーション法では、なるべく特異的なプローブを探すことが研究課題である。

すると例えば、黄色ブドウ状球菌だけに特異的なDNAを開発して用い、検体に黄色ブドウ状球菌がない場合、検出結果は陰性になる。そして次々にDNAの種類を替えて検出し、用意していた全てのDNAに検体が陰性であったとした場合でも、菌の有無自体は依然不明である。

そこで、本発明による感染症の診断方法で、ストレプトアビジン法とプローブ法とを併用した診断方法は、菌の有無を迅速に検出した検体について、迅速に正確に菌を同定するから、全体として迅速的確であるという効果をもたらす。

すなわち、ストレプトアビジン法で菌の有無を確認することが、菌がない検体にハイブリダイゼーションを繰り返すという不経済を防ぐ上で非常に有用である。

さらに、従来の染色法のように生体成分には染色せず、塗抹



染色標本中の菌等の特異的に染色するので、感染状況を熟練を要せずに迅速かつ的確に判断できる。

## 請求の範囲

1. 下記 i ~ ii のステップを含む感染症の診断システム。
  - i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
  - ii. 下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
    - ①. 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。
2. 下記 i ~ iii のステップを含む感染症の診断システム。
  - i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
  - ii. 下記①、②のステップを含む方法により、検体中の菌を検出する。
    - ①. 検体にストレプトアビジン (Streptavidin) を含むアビジン (Avidin) 様蛋白質を接触させる。
    - ②. 前記処理を施した検体に、酵素、抗体、色素、金 (Gold) 等の標識分子を結合させたビオチンを接触させる。
  - iii. 前記 ii において菌が検出された検体について、下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
    - ①. 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。
3. 下記 i ~ ii のステップを含む、検体中の菌を検出する方法。
  - i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。
  - ii. 下記①のステップを含む方法により検体中の菌を同定する。
    - ①. 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体

にハイブリダイゼーションを行う。

4. 下記 i ~ iii のステップを含む、検体中の菌を検出する方法。

i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。

ii. 検体にストレプトアビジンを含むアビジン様蛋白質を接触させる。

iii. 前記処理を施した検体に、酵素、抗体、色素、金 (Gold) 等の標識分子を結合させたビオチンに接触させる。

5. 下記 i、ii のステップを含む、検体中の菌を同定する方法。

i. 生体成分であって、血液、腹水その他食細胞を多量に含む分画又は成分である検体を固定する。

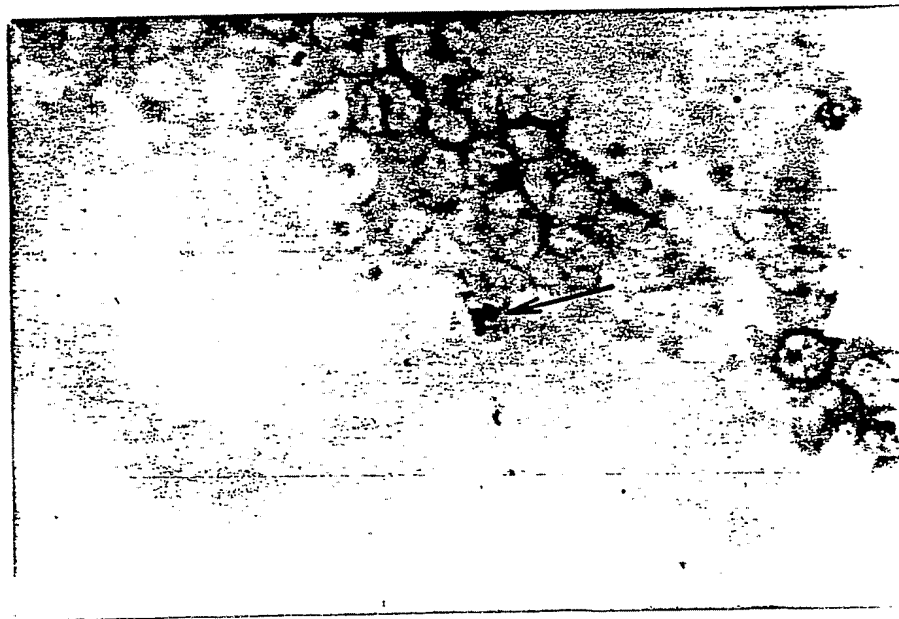
ii. 放射性、非放射性のどちらかのプローブを用いて検体にハイブリダイゼーションを行う。

1/11

Fig. 1



Fig. 2

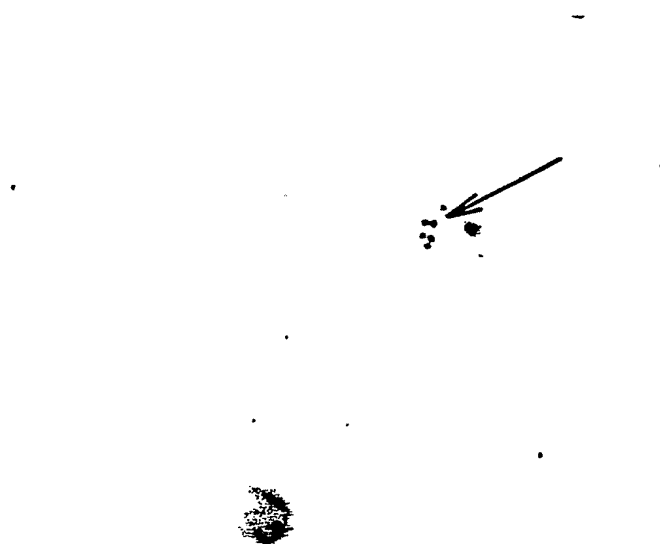


2/11

Fig. 3



Fig. 4



$\frac{3}{11}$ 

Fig. 5



Fig. 6



4/11

Fig. 7

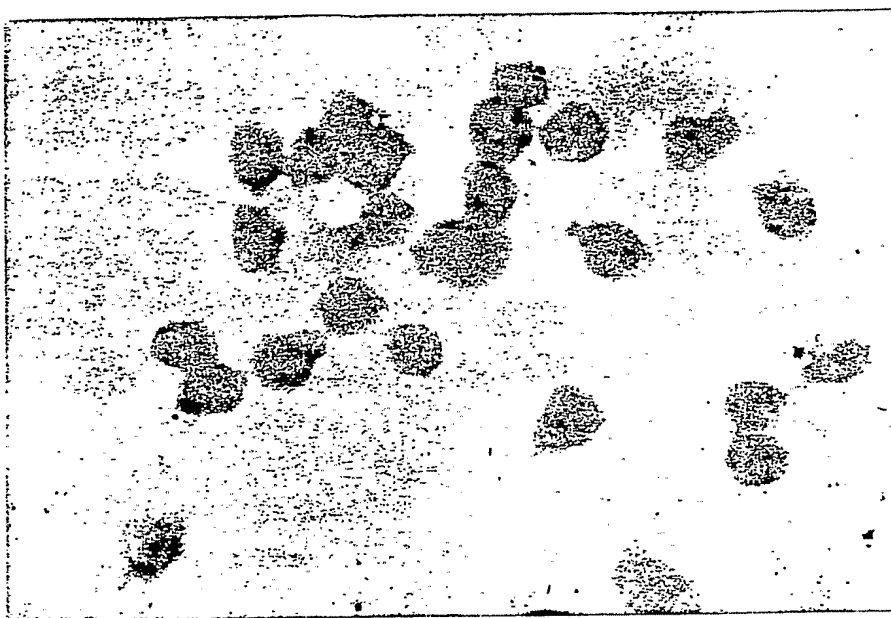
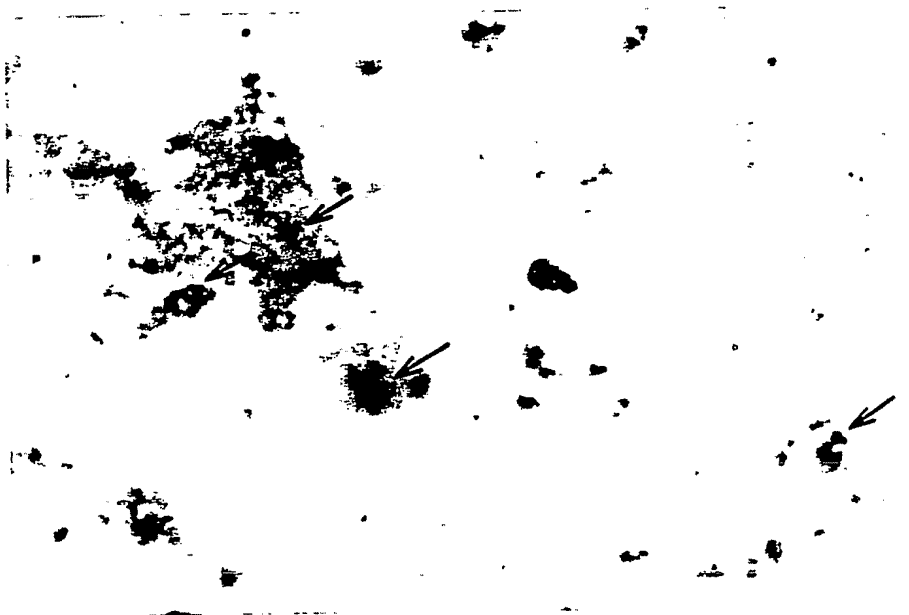


Fig. 8

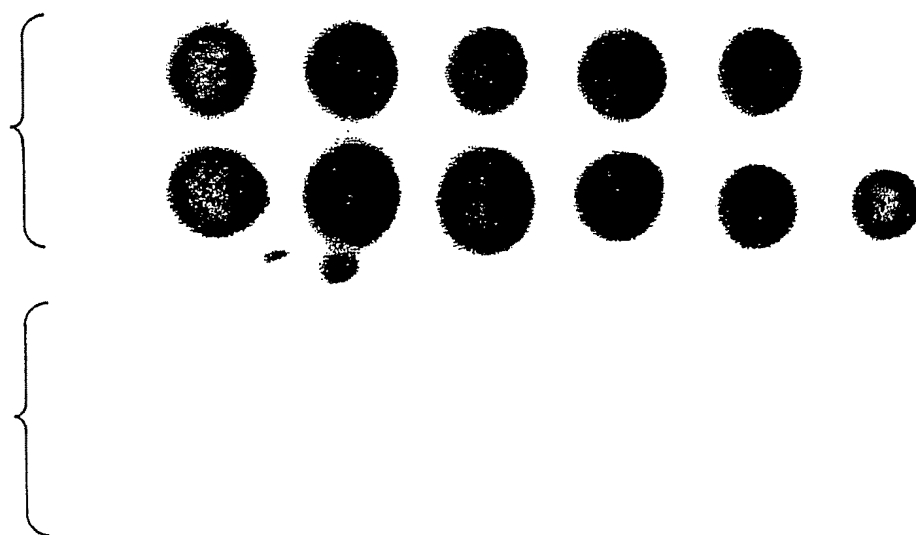


$\frac{5}{11}$ 

Fig. 9



Fig. 10





$\frac{6}{11}$ 

Fig.11

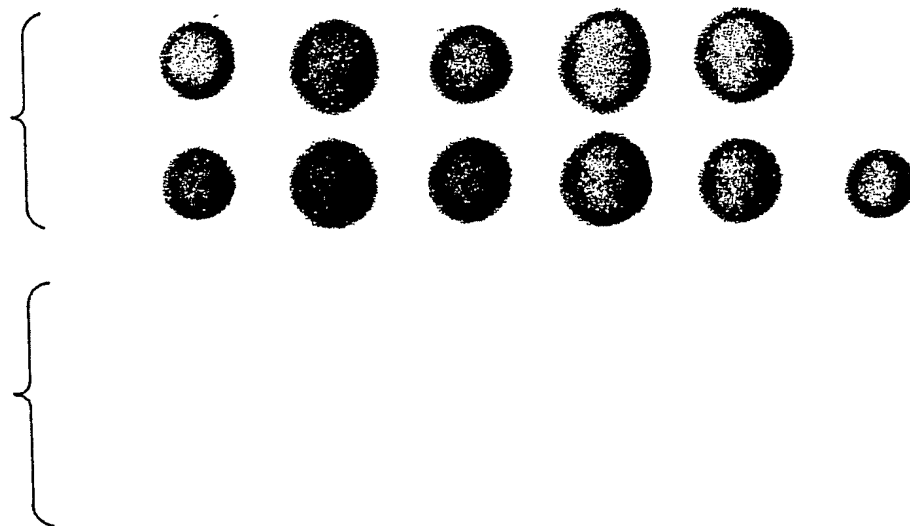
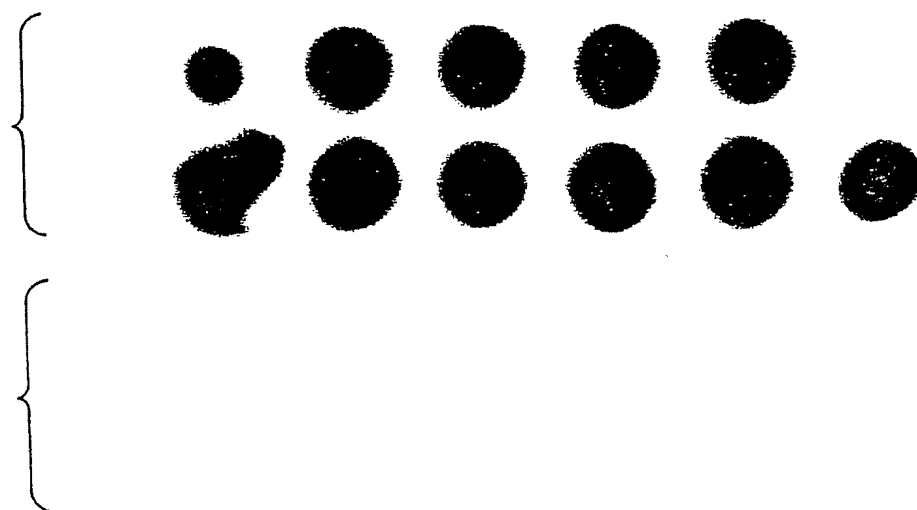
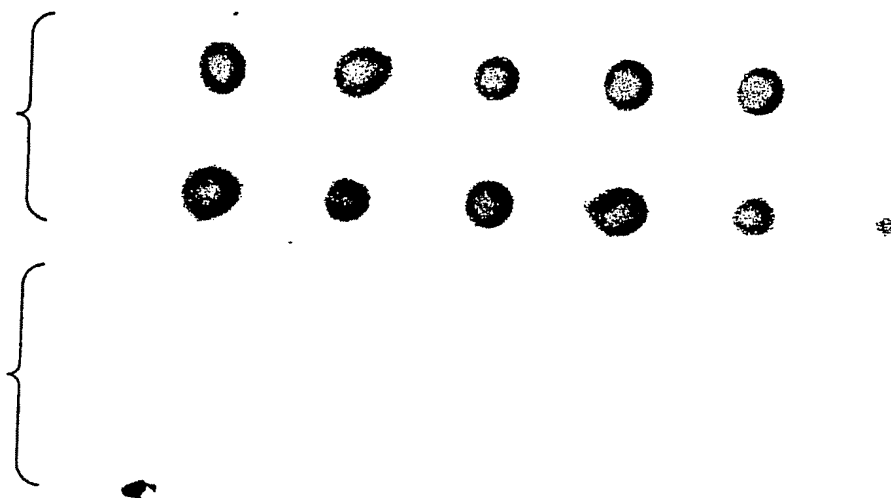


Fig.12



$\frac{7}{11}$ 

Fig. 13

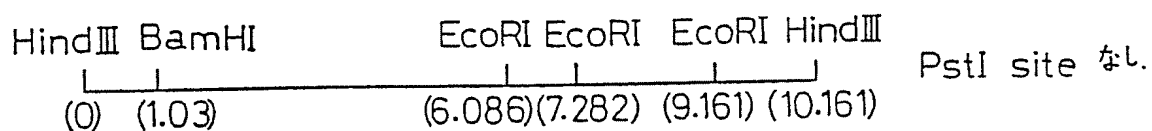


8/11

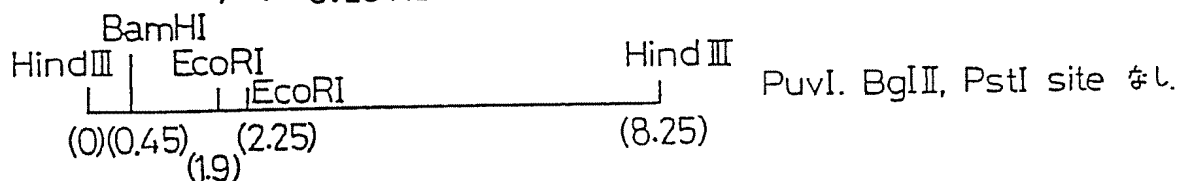
Fig. 14

## プロンプの制限酵素地図

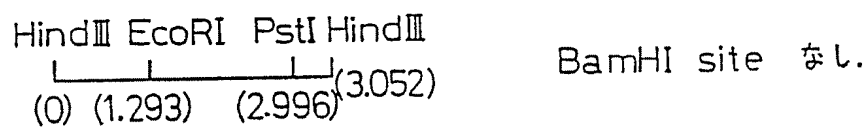
プロンプ24 ≅ 10.161 Kb



プロンプ7 ≅ 8.25 Kb



プロンプ77 ≅ 3.052



プロンプ36 ≅ 1.967



9/11

Fig. 15

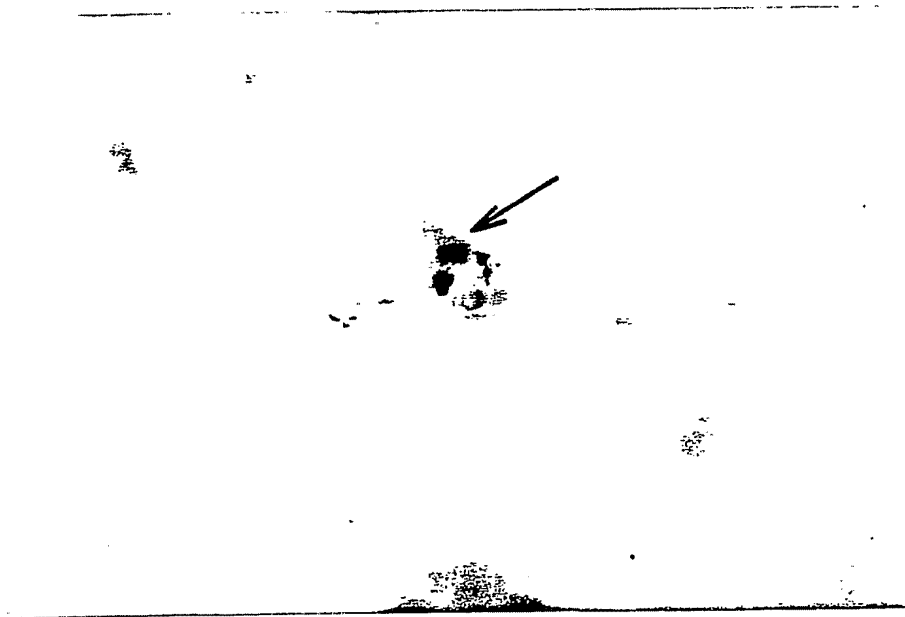


Fig. 16

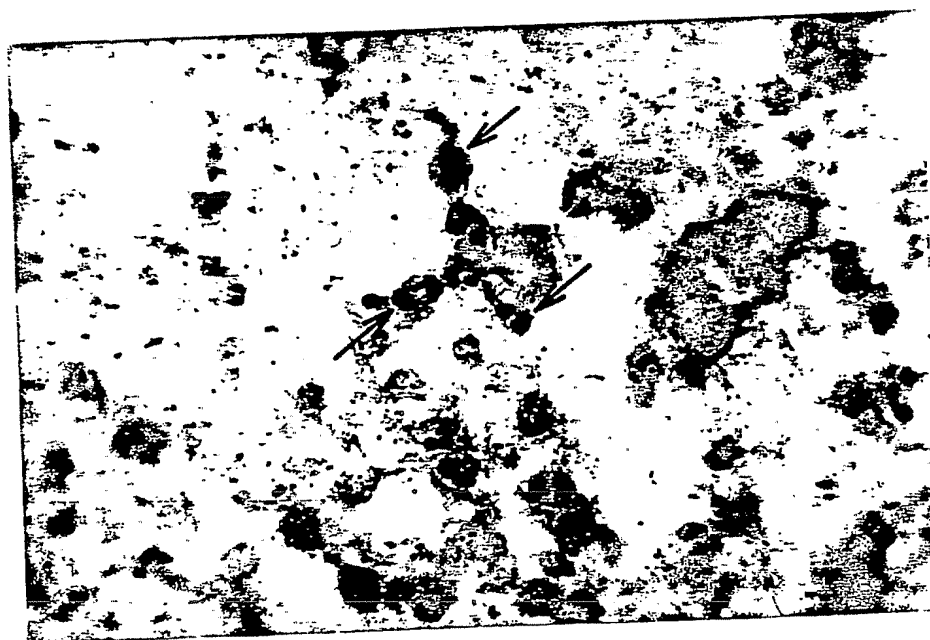


10/11

Fig. 17



Fig. 18



$11/11$ 

Fig. 19



Fig. 20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00424

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>4</sup> C12Q1/04, 1/68		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12Q1/04, 1/68	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
JICST Data Base, JICST7580 Data Base		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	BIO INDUSTRY, Vol. 4, No. 3, March, 1987 Takahashi Toyozo, Manda Toshihiro [DNA Probe niyoru Kansensho no Chokusetsu Shindan (2)] P. 43 - 58	1-3, 5
Y	Medical Technology, Vol. 15, No. 13 December 1987 (Tokyo) Yoshikawa Masanosuke [DNA Hybridization-ho niyoru Saikin Jinsoku Doteiho] P. 1234 - 1238	1-3, 5
A	Pediatrics, Vol. 27, No. 7, June 1986 (Tokyo) Nakamura Akira [Kansensho no Atarashii Kensaho 3] Candida Kogen Kenshutsu niyoru Shindan] P. 813 - 819	2, 4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
July 7, 1989 (07. 07. 89)		July 17, 1989 (17. 07. 89)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl<sup>4</sup></b> <b>C12Q1/04.1/68</b>		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
<b>IPC</b>	<b>C12Q1/04.1/68</b>	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
JICST Data Base, JICST7580 Data Base		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
<b>Y</b>	<b>BIO INDUSTRY</b> , 第4巻, 第3号, 3月, 1987 高橋豊三・満田年宏「DNAプローブによる感染症の直接 診断(2)」 p. 43-58	<b>1-3.5</b>
<b>Y</b>	<b>Medical Technology</b> , 第15巻, 第13号, 12月 1987 (東京) 吉川昌之介「DNAハイブリダイゼ ーション法による細菌迅速同定法」 p. 1234-1238	<b>1-3.5</b>
<b>A</b>	小児科, 第27巻, 第7号, 6月, 1986 (東京) 中村明「感染症の新しい検査法[3] カンジダー抗原検出に よる診断」 p. 813-819	<b>2.4</b>
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  「I」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  (理由を付す)  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の  日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出  願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解  のために引用するもの  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新  規性又は進歩性がないと考えられるもの  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の  文献との、当業者にとって自明である組合せによって進  歩性がないと考えられるもの  「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 <b>07.07.89</b>	国際調査報告の発送日 <b>17.07.89</b>	
国際調査機関  日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員  特許庁審査官    伊 藤    明    ㊟	<b>4 B 6 8 0 7</b>